

## Ověřování protilátek pro imunohistochemické stanovení

Klára Mičkeová, 3 ZL

Školitel: Ing. Tomáš Vlas

**Východisko:** Vyšetření schopnosti vazby komerčně dodaných monoklonálních protilátek bylo provedeno několika metodami, na různých antigenních substrátech a při různém stupni naředění. Použití různých substrátů a titrů bylo provedeno z důvodu nalezení optimálního postupu pro jejich následující využití.

**Cíl:** Cílem bylo ověření vazby (funkčnosti) několika typů monoklonálních protilátek pro jejich využití v praxi a nalezení optimálního postupu zpracování (substrát, titr protilátky, fixace, inkubace).

### Metodika:

Protilátky, u nichž jsem prováděla verifikaci:

Anti-PCNA (Purified, Clone PC10, EXBIO Praha a.s.)

Anti-Cytokeratins (Purified, Clone C-11, EXBIO Praha a.s.)

Anti-Cytokeratin 18 (Purified, Clone DC-10, EXBIO Praha a.s.)

Anti-alpha/beta-Tubulin dimer (Purified, Clone TU-10, EXBIO Praha a.s.)

Anti-alpha/beta-Tubulin dimer (Purified, Clone TU-8, EXBIO Praha a.s.)

Použité metody:

- a. Ověřování protilátek metodou imunofluorescence, rozdílné postupy inkubace a fixace substrátů (HEp-2, ASMA, PHA stimulované lymfocyty), stanovení optimálního titru protilátek.  
Využité titry protilátek: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400  
1:6, 1:12, 1:24, 1:48 – upravené pro anti-PCNA protilátku  
1:100 – pro PHA stimulované lidské lymfocyty

Použité způsoby inkubace buněk:

1. 15 min v 10 % FBS v PBS (inhibice ostatních antigenních epitopů)
  2. Bez předchozí inhibice v 10 % FBS v PBS
  3. 12 minut v 4,2 % paraformaldehydu
  4. 12 minut v 0,1 % tritonu
- b. Ověřování vazby anti-PCNA protilátek pomocí průtokové cytometrie (použitý materiál byla suspenze lidských stimulovaných lymfocytů)
  - c. Ověřování vazby anti-PCNA protilátek metodou imunoblotting

**Výsledky:** Jediný pozitivní výsledek získaný pro ověření anti-PCNA protilátek metodou imunofluorescence byl při titru 1:6 (substrát HEp-2 buňky, inkubace v 4,2 % paraformaldehydu) a 1:100 (substrát PHA stimulované lymfocyty). Titr anti-PCNA protilátek 1:50 až 1:400, s různými způsoby inkubace (zmíněné výše) HEp-2 buněk – vždy negativní výsledek. Detekce anti-PCNA protilátek metodou průtokové cytometrie a imunoblottingu přinesla pozitivní výsledky.

Protilátky anti-cytokeratins a anti-cytokeratin 18 vykazovaly vždy pozitivitu, rozsah titru 1:50 až 1:400 (substrát HEp-2 a ASMA buňky), metoda IF.

U ověřování anti-alfa/beta tubulin dimer protilátek jsem se nedocílila žádných pozitivních výsledků, rozsah titru 1:50 až 1:400 (substrát HEp-2 a ASMA buňky), metoda IF.

**Závěr:** Závěrem mé práce jsou následující poznatky:

- Průkaz vazby anti-PCNA protilátek (Purified, Clone PC10) metodou imonofluorescence vyšel pozitivní pouze při titru 1:6, v praxi nepoužitelné
- Anti-PCNA (Purified, Clone PC10) protilátka je schopná vazby na PHA stimulovaných lymfocytech při titru 1:100
- Protilátky proti cytokeratinům (Purified, Clone C-11) a cytokeratinům 18 (Purified, Clone DC-10) jsou funkční, využitelné v praxi
- Protilátky anti-alfa/beta tubulin dimer (Purified, Clone TU-8) nevykazují schopnost vazby, jsou nefunkční
- Anti-PCNA protilátky (Purified, Clone PC10) lze aplikovat pro měření na průtokovém cytometru a metodu imunoblotu pro detekci PCNA v buněčných suspenzích